

studies with chemical agents, it seems sufficient to consider the sensitive stages broadly, since any effect occurring at the time will depend on the local availability of reactive compound. Pro-oestrus is the earliest stage at which mating can take place, and ovulation begins about 8 h thereafter. During this time, oocytes enter metaphase I and metaphase II; 26 h after early mating the first zygotes in mitosis I are found⁷.

The experiments with triaziquone demonstrated that treatment at late pro-oestrus and oestrus (Experiment 2) was precisely enough timed to induce a high number of dominant lethals without affecting conception, ovulation and the implantation rate. Practically identical results were obtained in two different strains of mice. By and large, our results are comparable with those obtained by RÖHRBORN⁸ with triaziquone after hormonal pretreatment.

In Experiment 3, in which treatment is assumed to have been administered between ovulation and mitosis I, cytotoxic effects interfered markedly with fertility, particularly at the higher dose of triaziquone (0.25 mg/kg).

In contrast to the alkylating agent, phenylbutazone had no effect when given at the sensitive stage of oocyte

development; in this respect the results of the present experiment are in keeping with the negative results obtained in other types of mutagenicity study on somatic or gonadal cells^{8, 9, 13}.

Zusammenfassung. Bei weiblichen Mäusen induzierte Triaziquon unter konventionellen Laboratoriumsbedingungen dominante Letalfaktoren, wenn die Substanz im Pro-Oestrus oder im Oestrus verabreicht wurde. Weniger gut geeignet erwies sich diese Applikation wenige Stunden nach Kopulation, da embryotoxische Wirkungen auftraten. Im Gegensatz zu Triaziquon führte Phenylbutazon – weiblichen Mäusen im Oestrus verabreicht – nicht zu dominanten Letaleffekten.

L. MACHEMER and R. HESS

*Biological Research Laboratories,
Pharmaceuticals Division of CIBA-GEIGY Limited,
CH-4002 Basel (Schweiz), 10 October 1972.*

¹³ D. MÜLLER and F. F. STRASSER, *Mutation Res.* 13, 377 (1971).

Le Lumomagnésion: marqueur fluorescent de l'os

«ANTOINE MIZAUD, médecin de Paris, paraît avoir remarqué le premier vers le milieu du seizième siècle, l'action de la garance sur les os. Mais il faut avouer que l'observation de MIZAUD était entièrement oubliée, lorsque plus d'un siècle et demi après lui, BELCHIER et DUHAMEL appelèrent, sur le fait important dont il s'agit, l'attention des anatomistes». C'est en ces termes que FLOURENS¹ rappelle la première observation de marquage in vivo du squelette et, en même temps, évoque l'intérêt de cette technique.

Mais c'est durant les vingt dernières années, que de grands progrès se sont produits dans la mise au point de divers marqueurs fluorescents de l'ostéogénèse. Outre l'alizarine extraite de la garance, on a vu successivement les tétracyclines², la quercétine³, les porphyrines^{4, 5}, la calcéine verte⁶, les différents Procions^{7, 8}, la calcéine bleue⁹ et enfin le xylénorange¹⁰.

Cette grande variété et la gamme de couleurs disponibles réduisent sans doute la valeur d'une recherche de nouveaux marqueurs du calcium en voie de dépôt dans le tissu osseux. Cependant, le squelette comporte d'autres sels minéraux dont le rôle éventuel est trop souvent imprécis et dont le mode d'incorporation est mal connu. Parmi ceux-ci, nous savons que le magnésium est, quantitativement, le quatrième cation de l'os. La moitié du magnésium total du corps humain se trouve dans le squelette. La mise en évidence de ce minéral au moment de sa pénétration dans l'os pourrait donc présenter un certain intérêt.

Certains auteurs^{11, 12} considèrent le Lumomagnésion¹³ comme le produit le mieux adapté à la détection du magnésium en fluorométrie de solutions aqueuses. Nous avons pensé utiliser cette propriété en administrant le Lumomagnésion à l'animal vivant avec l'espoir d'y marquer en fluorescence le magnésium au moment de son dépôt dans le tissu osseux. Toutefois, avant d'entreprendre l'expérimentation in vivo, il était nécessaire de déterminer avec certitude si le Lumomagnésion était réellement sélectif dans la mise en évidence, in vitro, du magnésium, par fluorométrie. Les essais ont démontré qu'en fait ce produit détecte parfaitement le magnésium mais qu'il décèle

également les traces de calcium quoiqu'en produisant une fluorescence moins intense que pour le magnésium. Des mesures quantitatives précises n'ont pas été effectuées, le seul fait qualitatif de la non sélectivité rigoureuse étant utilisé. Dix jeunes chiens (âgés de 3 à 6 mois) ont reçu des injections par diverses voies. Les quantités suivantes de Lumomagnésion ont été injectées: par voie i. p., de 50 à 300 mg/kg d'animal; par voie i. v. de 10 à 20 mg/kg; par voie i. m., de 50 à 80 mg/kg. Les injections n'ont provoqué aucune réaction chez les animaux d'expérience. Le produit a été parfaitement toléré. Les chiens ont été sacrifiés à des intervalles variant de 2 h. à 15 jours après l'injection. Les pièces osseuses ont subi les manipulations de routine pour l'enrobage au méthacrylate de méthyle (passages successifs au méthanol, chloroforme et toluol).

Technique. Le Lumomagnésion est un sel sodique du 2-hydroxy-3-sulfo-5-chlorophénylazo-1-acid barbiturique, très soluble dans l'eau. La solution à 50 mg par ml fut utilisée. Dix jeunes chiens (âgés de 3 à 6 mois) ont reçu des injections par diverses voies. Les quantités suivantes de Lumomagnésion ont été injectées: par voie i. p., de 50 à 300 mg/kg d'animal; par voie i. v. de 10 à 20 mg/kg; par voie i. m., de 50 à 80 mg/kg. Les injections n'ont provoqué aucune réaction chez les animaux d'expérience. Le produit a été parfaitement toléré. Les chiens ont été sacrifiés à des intervalles variant de 2 h. à 15 jours après l'injection. Les pièces osseuses ont subi les manipulations de routine pour l'enrobage au méthacrylate de méthyle (passages successifs au méthanol, chloroforme et toluol).

¹ P. FLOURENS, Gide Paris, (1842).

² R. H. MILCH, D. P. RALL and J. E. TOBBIE, *J. natn. Cancer Inst.* 19, 87 (1957).

³ W. E. RIBELIN, M. S. MARSI and F. DEEDS, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 103, 271 (1960).

⁴ L. COUTELIER, A. DHEM et A. VINCENT, *Bull. Acad. R. Med. Belg.* 7^e série 3, 657 (1963).

⁵ L. COUTELIER, *Revue belge Path. Méd. exp.* 30, 369 (1964).

⁶ H. K. SUSUKI and A. MATHEWS, *Stain Techn.* 41, 57 (1966).

⁷ P. P. GOLAND and N. G. GRAND, *Am. J. phys. Anthropol.* 29, 202 (1968).

⁸ G. H. PRESCOTT, D. F. MITCHELL and H. FAMMY, *Am. phy. Anthropol.* 29, 219 (1968).

⁹ B. A. RAHN and S. M. PERREN, *Experientia* 26, 519 (1970).

¹⁰ B. A. RAHN and S. M. PERREN, *Stain Techn.* 46, 125 (1971).

¹¹ G. V. SEREBRYAKOVA, A. M. LUKIN and E. A. BOZHEVOL'NON, *Zh. analit. Khim.* 18, 706 (1963); *Analyt. Abstr.* 1964, 3003.

¹² I. I. KURBATOVA, *Zav. Lab.* 32, 1064 (1967); *Analyt. Abstr.* 1967, 7501.

¹³ British Drug Houses Ltd, Poole (England).

Les coupes d'une épaisseur moyenne de 60 μm ont été examinées en fluorescence et comparées aux microradiographies correspondantes.

Résultats. Lorsque les animaux sont sacrifiés quelques heures après l'injection de Lumomagnésion, l'examen des coupes transversales diaphysaires révèle la présence d'une fluorescence de couleur rouge-brique disposée en anneaux ostéoniques récemment déposés, c'est-à-dire au contact des lisérés préosseux et en dépôts linéaires sous-périostiques et endostiques de bordure. Les coupes longitudinales métaphysaires présentent une zone de fluorescence immédiatement sous le cartilage de croissance, indiquant l'imprégnation par le fluorochrome du cartilage récemment minéralisé. Les coupes transversales pratiquées au même niveau confirment cette observation. Aux échéances plus tardives soit jusqu'à quinze jours après l'injection de fluorochrome, les zones de fluorescence sont enfouies sous de nouvelles couches osseuses lamellaires, soit au sein des ostéones, soit aux niveaux sous-périostiques et endostiques.

Discussion. Il apparaît que le marquage par le Lumomagnésion, vu en fluorescence, ne diffère en rien, au point de vue des localisations, de celui des tétracyclines que l'on a coutume de prendre comme référence puisque ses modalités paraissent les mieux connues. C'est la raison pour laquelle, il n'a pas été jugé nécessaire d'en faire la démonstration photographique. Aux échéances brèves et par comparaison aux microradiographies, selon la technique utilisée par GHOSZ¹⁴ pour la tétracycline, nous avons pu établir que ce marquage se situe au niveau de la ligne-frontière du liséré préosseux. Aucune autre structure n'est rendue fluorescente, que ce soit des logettes ostéocytaires, les surfaces neutres ou les zones de résorption. On sait en effet qu'au niveau des logettes ostéocytaires une certaine confusion est parfois possible. La tétracycline peut imprégner les parois de ces logettes mais selon des modalités actuellement mal connues; cette imprégnation est parfois irrégulière, certaines logettes sont fluorescentes, d'autres pas, sans que l'on en connaisse la raison. De plus, certains artéfacts, tels que la présence d'air ou une fixation insuffisante des pièces, peuvent donner l'aspect d'une pseudo-fluorescence de couleur jaune par effet optique. Enfin certains fluorochromes, comme l'alizarine observée à brève échéance, peuvent imprégner fortement toutes les surfaces non seulement celles qui présentent une ostéogénèse mais aussi les logettes ostéocytaires, les surfaces indifférentes et les zones de résorption. Par contre, le Lumomagnésion se comporte comme les porphyrines; son marquage très précis ne concerne que les zones d'ostéogénèse ou de calcification.

A plus longue échéance, le marquage par Lumomagnésion est bien enfoui au sein de l'ostéone, sous forme d'un anneau régulier concentrique au canal de Havers. Aucune autre structure n'est illuminée. Cet anneau concerne

exclusivement l'ostéogénèse en cours au moment de l'administration du produit.

Tous les animaux injectés ont présenté un marquage fluorescent, quels que soient la quantité de produit utilisé, le mode d'injection employé et l'échéance d'observation, après quelques heures ou après 15 jours. Le nombre d'animaux injectés est suffisant pour affirmer la régularité et la constance de l'incorporation du Lumomagnésion dans le tissu osseux.

La précision, l'importance du marquage et ses localisations identiques indiquent que le Lumomagnésion se comporte comme les autres marqueurs, en se liant soit à la trame collagène soit au minéral en voie de dépôt.

Le traitement des pièces osseuses pendant quelques heures, soit par HCl, 0,1 N soit par EDTA (versène) amène la disparition complète de la fluorescence. Cependant ni les examens prolongés en rayonnement ultraviolet ni les nombreuses manipulations sans précautions particulières n'ont altéré l'intensité et la stabilité de la fluorescence.

Compte tenu des techniques d'injection, du type d'animal utilisé et des délais d'observations, le Lumomagnésion n'a apparemment provoqué aucun phénomène toxique observable tant au plan général qu'au niveau de l'évolution de l'ostéogénèse. S'il est donc utilisable dans les conditions habituelles d'expérimentation animale, on ne peut cependant parler de toxicité nulle puisqu'aucune analyse toxicologique n'a été exécutée.

En conclusion, le Lumomagnésion est un marqueur fluorescent du dépôt minéral global de l'os. Il est stable et peu coûteux. Son utilisation est extrêmement simple. Il prend place dans l'arsenal déjà bien fourni des marqueurs *in vivo* de l'ostéogénèse générale et de la minéralisation du cartilage de croissance dans le premier stade de l'ossification endochondrale.

Summary. Lumomagneson is reported as detector of magnesium by mean of fluorometry. When injected *in vivo* in young dogs, it is suitable as fluorescent marker of the mineral deposit in all sites of ossification, but it is not suitable for distinguishing between calcium and magnesium deposits.

L. COUTELIER¹⁵

*Laboratoire de Recherches de chirurgie orthopédique,
Université Catholique de Louvain,
12, Minderbroederstraat
B-3000 Louvain (Belgique), 28 juin 1972.*

¹⁴ J. P. GHOSZ, *Clich. Biol.* Liège 70, 169 (1959).

¹⁵ Ce travail a bénéficié de l'aide du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et de la Commission des Communautés Européennes.

Effects of Metopirone on Duodenal Differentiation and Yolk Sac Retraction in Chick Embryos¹

Adrenocorticoid injection accelerates² and 'hypophysectomy'³ arrests duodenal differentiation and yolk sac retraction in chick embryos, implying that adrenocorticoids are important for these developmental processes.

Since no one has reported successful adrenalectomy of chick embryos we hoped that metopirone (an inhibitor of 11- β -hydroxylase), would specifically block 11- β -oxycorticosteroid synthesis⁴ in chick embryos and presumably show the effects of deprivation on the development of these apparently corticoid dependent or stimulated

processes. Metopirone, probably hormonally inactive⁴ was not toxic when even as much as 4.0 mg per embryo was given on days 12, 14, 16 and 18 of incubation (SKIDD)⁵. But, such treatments slightly decreased adrenal gland weights.

We compared rates of body growth, yolk sac retraction and duodenal differentiation (alkaline phosphatase specific activity, protein content, morphogenesis) assessed as before^{3, 6-8} in intact White Leghorn chick embryos (PB-58) incubated at $\sim 39^\circ\text{C}$ and 60% relative humidity.